

复方丹参滴丸抑制血管异位钙化

张江蓉, 王一尘, 沈 丽, 卢维晟

(上海第二医科大学附属新华医院老年科, 上海市 200092)

[关键词] 病理学与病理生理学; 复方丹参滴丸抑制血管钙化; 酶法; 复方丹参滴丸; 血管钙化; 维生素 D; 钙转移

[摘要] 目的 在大鼠动脉钙化模型上观察复方丹参滴丸对钙化血管的作用和钙沉积部位的变化情况。方法 28 只大鼠随机分为正常对照组、维生素 D 组和复方丹参组。维生素 D 组和复方丹参组用维生素 D₃ 乳剂灌胃 3 天, 对照组在同等时刻给予等容量对照乳剂灌胃。从实验第 4 天至第 9 周结束, 复方丹参组每日给予复方丹参滴丸溶于生理盐水中灌胃, 另两组分别给予等容量生理盐水灌胃。9 周末取胸主动脉做病理切片, 并检测血管、骨组织钙和血脂、血钙水平。结果 维生素 D 诱发的血管钙化和骨质疏松模型成功, 病理可见明显的钙化结节, 且维生素 D 组与对照组比较血管壁钙含量明显增加, 而骨钙则明显减少; 复方丹参组与维生素 D 组和对照组比较差异有显著性。结论 复方丹参滴丸可抑制血管钙化, 并能将钙转移到骨骼刺激骨形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Complex Dribbing Pill of Danshen on Inhibition of Vascular Calcification

ZHANG Jiang-Rong, WANG Yi-Chen, SHEN Li, and LU Wei-Sheng

(Department of Geriatrics Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China)

[KEY WORDS] Danshen Pills; Vascular Calcification; VitD; Calcium Transfer; Vessels Calcium; Bone Calcium

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of complex dribbing pill of danshen pills (DSP) to the calcific vessels and the change of the calcium deposition on the model of vascular calcification in rats. **Methods** 28 rats were divided into 3 groups randomly: control group ($n=9$), VitD group ($n=10$), VitD+ DSP group ($n=9$). VitD group and VitD+ DSP group were given by VitD and rats at control group were given the control medicine at the same volume and time. From the fourth day to the ninth week, the VitD+ DSP group was given by 15 pills DSP and to the other groups were given by NaCl. At the end of the ninth week, to analyze the role of DSP to the vascular calcification and the effect of calcium deposition, pathological sections with the rats' thoracic aorta were made and calcium in blood, vessels and bones were detected, and so on. **Results** The model of vascular calcification and osteoporosis with VitD had been succeeded. There were typical calcific nodules in vessels. The levels of calcium in vessels in VitD group were obviously higher than those in control group, but the levels of calcium in bones in VitD group were lower than those in control group. DSP can inhibit vascular calcification and transfer the calcium to bones to promote their formation. Significant difference were observed in 3 groups. **Conclusion** DSP can inhibit vascular calcification availably and transfer the calcium to bones to promote their formation.

血管钙化(血管异位钙化)是动脉粥样硬化、糖尿病、肾病、衰老和高血压等多种疾病的病理生理基础,是心血管疾病的主要危险因素。血管异位钙化和骨质疏松往往同时发生,且随着年龄的增加而明显增加,尤其是在老年人、雌激素缺乏和自身免疫性疾病中较多见,也是老龄化社会中致残、致死的主要原因^[1]。近来人群纵向研究发现血管钙化和骨质疏松的程度平行:骨质丧失越多,血管钙化进程越严重^[2-4],两者之间有着密切的联系。复方丹参滴丸(danshen pills, DSP)作为一种钙拮抗剂,能抑制钙的

内流,并有降血脂作用。但目前影响血管异位钙化的研究尚不多见,对血管中减少的钙能否沉积于骨组织也缺乏研究。本实验拟在大鼠动脉钙化模型基础上观察 DSP 对钙化血管的作用、钙沉积部位的变化,进一步为动脉粥样硬化和骨质疏松的共同防治和开展中医治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

标准饲料配方:水分 10.0%、碳水化合物 60.0%、粗脂肪 4.5%、粗纤维 5.0%、粗蛋白 20.5%。维生素 D 乳剂由上海信谊金朱药业有限公司提供;复方丹参滴丸由天津天士力公司提供;全自动生物化学分析仪为 Beckman 公司产品。

[收稿日期] 2004-11-10

[修回日期] 2005-08-30

[作者简介] 张江蓉, 硕士, 主治医师, 从事动脉粥样硬化研究, 联系电话为 021-65790000, E-mail 为 zjrangela@yeah.net。王一尘, 教授, 硕士研究生导师, 从事动脉粥样硬化基础和临床研究。

1.2 动物分组及模型的建立

1.0~1.5月龄健康雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠(使用许可证:SYXK沪-2003-0031)28只,体重150~180g。适应性喂养一周后,随机分为正常对照组($n=9$)、维生素D组($n=10$)和DSP组($n=9$)。分组当天定为实验0时,分别在0、24和48h给予维生素D组和DSP组维生素D₃乳剂灌胃,剂量为每天400 000 IU/kg;对照组在同一时刻给予等容量对照乳剂灌胃。实验全程3组大鼠均饲以标准饲料。实验第4天至第9周结束,DSP组每天给予DSP 15 pill/kg(常用剂量转换而得)溶于生理盐水1 mL中灌胃,另2组分别给予等容量生理盐水灌胃。第4周末处死维生素D组1只大鼠取主动脉做病理切片,检查动脉钙化模型建立情况。实验过程中大鼠自由进食进水。维生素D组和DSP组在维生素D灌胃后曾出现一过性食欲下降。总体实验前后各组大鼠体重无明显差异($P>0.05$)。因灌胃技术不成熟而致DSP组一大鼠窒息死亡。

1.3 病理指标观察

实验第9周末全部大鼠用速眠新(1 mL/kg)腹腔麻醉,取颈动脉血致死。取胸主动脉置入10%福尔马林中固定24 h,随后包埋、切片。分别进行HE染色,光镜下观察动脉粥样病变情况。Von Kossa染色显示钙化部位。

1.4 血管和骨组织钙测定

取肾动脉上1 cm到髂总分叉处腹主动脉段,烘干称重,浓硝酸硝化适当稀释后电极法测定血管壁钙。取右侧股骨组织,去离子水冲洗,加入30% H₂O₂浸泡30 min,再用去离子水冲洗至澄清,置烘箱内,110℃ 2 h烘干。用陶瓷器皿研磨骨至粉碎状,称重,以2 mL 14 mol/L浓HNO₃加热硝化成澄清液体,去离子水适当稀释降低酸度。自动生物化学仪酶法测定骨组织钙(试剂盒购自Beckman公司)。

1.5 生物化学指标测定

全自动生物化学仪酶法测定血清总胆固醇(tor-

tal cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。血清钙采用电极法测定。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;计量资料采用 t 检验或方差分析(3组间两两比较采用LSD检验);计数资料采用 χ^2 检验。用SPSS10.0软件进行统计工作。

2 结果

2.1 各组血管壁钙含量和骨组织钙含量变化

维生素D组与对照组比较血管壁钙含量明显增加($P<0.01$)。DSP组与维生素D组比较血管壁钙含量降低了28.8%($P<0.01$),而DSP组与对照组比较无明显差异。三组骨组织钙含量比较差异有非常显著性($P<0.01$),维生素D组与对照组比较骨组织内钙含量减少($P<0.01$),DSP组大鼠骨组织内钙含量与维生素D组比较显著增高($P<0.01$)(表1, Table 1)。

表1. 三组血管壁和骨组织钙含量的比较($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/g}$)

Table 1. The content of calcium($\mu\text{mol/g}$) in vessels and that in bones

分 组	<i>n</i>	血管壁钙	骨组织钙
对照组	9	26.4 \pm 2.9	692.9 \pm 52.4
维生素D组	9	36.1 \pm 8.0 ^b	266.1 \pm 38.5 ^b
复方丹参组	8	25.7 \pm 5.7 ^a	518.8 \pm 46.1 ^{ab}

a: $P<0.01$, 与维生素D组比较; b: $P<0.01$, 与对照组比较。

2.2 各组血脂水平及血钙的变化

各组间血脂和血钙差别均无显著性。但DSP组TC与维生素D组比较有明显降低($P<0.05$)(表2, Table 2)。

表2. 各组血脂及血钙的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The change of calcium and lipid in blood among three groups

分 组	TC	TG	HDLC	LDLC	Ca
对照组	1.49 \pm 0.20	1.53 \pm 0.37	1.07 \pm 0.14	0.31 \pm 0.08	2.42 \pm 0.21
维生素D组	1.71 \pm 0.29	1.51 \pm 0.33	1.29 \pm 0.23	0.39 \pm 0.10	2.41 \pm 0.11
复方丹参组	1.39 \pm 0.28 ^a	1.48 \pm 0.27	1.18 \pm 0.16	0.36 \pm 0.10	2.34 \pm 0.18

a: $P<0.05$, 与维生素D组比较。

2.3 各组大鼠主动脉切片 HE 染色和 von Kossa 染色结果

三组大鼠主动脉切片 HE 染色结果见图 1(Figure 1), 图 1c 清楚地显示了典型动脉粥样硬化病变,

图 1d 显示 DSP 干预后斑块消失。von Kossa 染色结果见图 2(Figure 2), 图 2b 显示主动脉壁中膜有大量黑色颗粒沉积(表示钙化), 图 2c 提示 DSP 干预后黑色颗粒沉积明显减少。

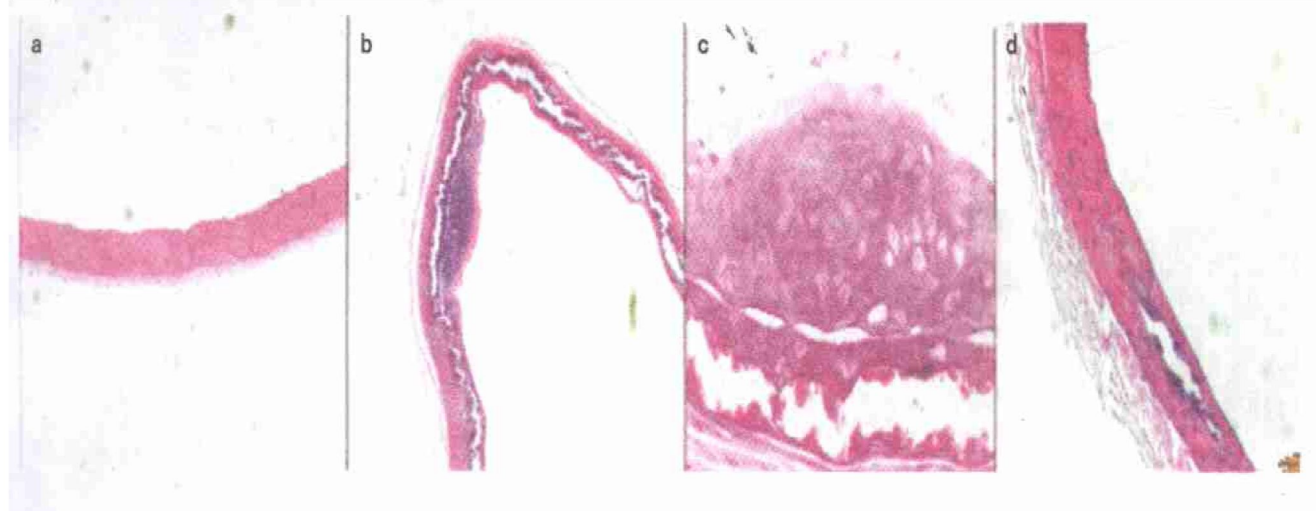


图 1. 三组大鼠胸主动脉 HE 切片 a 为对照组($\times 40$), b 为维生素 D 组($\times 40$), c 为维生素 D 组($\times 100$), d 为 DSP 组($\times 100$)。

Figure 1. Rat thoracic aorta section by HE staining

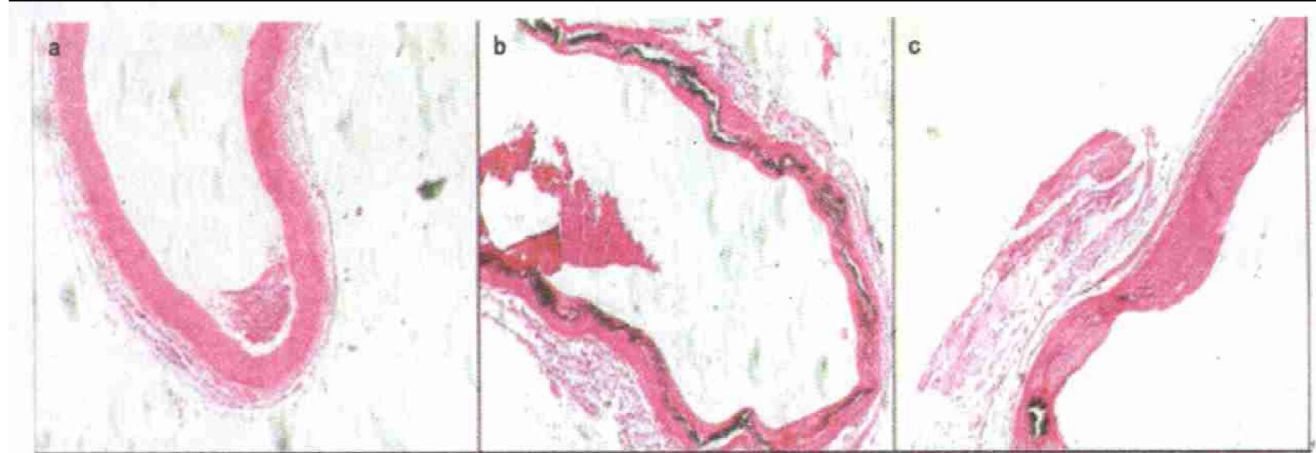


图 2. 三组大鼠胸主动脉 Von Kossa 切片($\times 40$) a 为对照组, b 为维生素 D 组, c 为 DSP 组。

Figure 2. Rat thoracic aorta section by Von Kossa staining

2.4 相关分析

单因素分析结果表明, 血管壁的钙含量程度和骨组织钙含量呈负相关($r = -0.543$, $P < 0.01$); 与其它血钙、血脂等指标无相关性。血管壁钙含量(y)与骨组织钙含量(x)关系的直线回归方程为 $y = 40.27 - 0.0218x$ 。

3 讨论

大剂量维生素 D 诱发血管钙化的病理模型已应用 60 余年^[5], 维生素 D 诱发动脉钙化是由于它能增加脂质和钙的吸收和沉积。Price 等^[6]曾发现大剂量的维生素 D 通过促进骨溶解, 提高血清钙浓度

达 30% 以上。由于增加维生素 D 的摄入量可增加动脉钙化和骨质疏松的发病率, 所以提出维生素 D 过量可能促使骨组织中一部分钙转移致动脉上, 同时促发了动脉钙化和骨质疏松。维生素 D 400 000 IU/kg(每日一次)加溶媒连续给药 3 天, 基本无大鼠死亡, 引起的血管钙化程度适中, 为较理想的造型方案^[7, 8], 本实验正是用这种方法建立了实验模型。于 4 周末处死维生素 D 组大鼠 1 只, 取主动脉作 HE 染色清楚地显示了动脉粥样斑块, von Kossa 染色呈现典型钙化结节, 证实模型建立成功。而本研究结果发现维生素 D 组与对照组相比血管壁钙含量明显增高, 而骨组织钙含量则显著降低并具有统计学意义, 进一步说明大剂量维生素 D 诱发的动脉钙化

和骨质疏松实验模型建立成功。

正常的骨代谢有骨吸收和骨形成两个方面。如骨骼中的钙被析出进入血液后沉积于动脉血管壁即形成血管异位钙化。钙化的血管舒张功能降低、僵硬性增加,往往导致血栓形成和动脉粥样斑块破裂等严重后果^[9, 10]。血管钙化往往与骨质疏松同时发生并随着年龄的增加而增加,两者的共同因素即钙的沉积部位的改变。钙从骨组织中流失导致骨质疏松,而钙沉积于动脉血管壁上则导致血管钙化和动脉硬化。

血管钙化是动脉粥样硬化的必然特征之一。近年来用钙拮抗剂预防动脉粥样硬化的研究业已得出结论。钙在血浆和细胞内的浓度相差一万倍,故在任何细胞膜损伤的情况下,钙自然顺浓度差进入受损的细胞内。当血管内膜损伤或高脂状态可使动脉内膜胆固醇增加,进而扩大钙经慢通道进入细胞,造成细胞钙超负荷,最终导致细胞的死亡,并释放膜活性物质,促进平滑肌(SMC)的增殖和表型改变,导致弹力纤维和胶原纤维增多,造成血管钙化^[11]。而钙拮抗剂可抑制平滑肌细胞的增殖和迁移,抑制中性粒细胞和巨噬细胞的趋化活动,抑制或预防脂质氧化所致的内皮损伤,抑制基质的合成,阻碍钙在斑块蓄积。复方丹参滴丸(DSP)是我国目前唯一通过美国FDA临床用药申请(IND)的治疗心血管疾病的中成药。近年来大量的动物实验和临床实践证实DSP是一种钙拮抗剂,它能抑制KCl激发的钙内流,并有降血脂作用,明显影响As动脉壁中钙、胆固醇和基质成分的聚积,明显减少As的面积,减轻血管钙化^[11]。

本实验选用DSP进行干预,结果发现:三组血管壁钙含量和骨钙含量比较差异均有显著性。DSP干预后即DSP组与维生素D组比较血管壁钙含量明显减少达28.8%,已经回到对照组水平(均值略低于对照组),而骨钙含量则明显增加,几乎达一倍,但与对照组比较还相差甚远($P < 0.01$)。这一结果提示DSP能减少大剂量维生素D所造成的钙在血管壁上的沉积并将钙转移至骨骼促进骨形成,且抑制血管钙化作用更强。图1d也证实DSP干预后斑块消失,图2c提示DSP干预后血管钙化明显减少。从三组血脂、血钙等指标比较来看并无统计学意义($P > 0.05$),而两两比较只有DSP组比维生素D组的胆固醇TC明显降低($P < 0.05$),这与文献报道的DSP降血脂作用相一致。正因为DSP的降血脂作用和减少血管壁钙的沉积才有效地减缓动脉粥样硬化的发生和发展,从而降低心血管病的发生率。而血

钙的变化不仅牵涉到钙从组织中的释放,还有和很多钙代谢激素有关,它往往不能完全反映体内钙的真实生理状态,所以血钙的意义无特异性,可能由机体的代偿作用造成血钙相对平衡。从各指标的单因素相关分析结果来看血管壁的钙含量程度和骨组织钙含量呈负相关($r = -0.543$, $P < 0.01$);与其它血钙、血脂等指标无相关性,也就是说血管壁钙沉积并不是血钙升高的直接结果。血管壁的钙含量增加,骨组织钙含量则减少;血管壁的钙含量减少,骨组织钙含量就增加,两者呈直线关系。本实验结果证实通过DSP的干预可以改变钙的沉积部位,使其在血管壁上沉积减少而转运并沉积于骨骼上,这样既抑制了血管钙化又增加了骨的形成。本研究也存在一些不足之处,首先本研究的样本量较小。虽然在统计学上已有意义,但增加样本量可能更有说服力。另外,DSP组使用的是常规剂量,如设计成低、中、高不同剂量组,其结果对临床更有指导意义。

综上所述,维生素D 400 000 IU/kg(每日一次)加溶媒连续给药3天是较理想的血管钙化的造模方案,基本无大鼠死亡,引起的血管钙化程度适中。血管异位钙化和骨质疏松密切相关。本实验提示DSP可以抑制血管钙化并将钙转移至骨骼增加骨形成。这对动脉粥样硬化和骨质疏松的共同防治和开展中医治疗具有一定的临床价值。

[参考文献]

- [1] Parhami E, Garfinkel A, Demer LL. Role of lipids in osteoporosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2 346-348
- [2] Hak AE, Pols HAP, Hemert AMV. progression of aortic calcification is associated with metacarpal bone loss during menopause. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 1 926-931
- [3] Kiel DP, Kaupilla LI, Cupples LA. Bone loss and the Framingham heart study. *Calcif Tissue Inter*, 2001, **68** (5): 271-276
- [4] Von der Recke P, Hansen MA, Hassager C. The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med*, 1999, **106**: 273-278
- [5] Lee Co, Hermann RG. Effect of vitamin D, sucrose, corn oil and endocrines on tissue cholesterol in rats. *Circ Res*, 1959, **7** (3): 354-358
- [6] Price PA, Fause SA, Williamson MK, Kong YY. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (5): 817-824
- [7] 孙安阳, 俞彰, 钟慈声, 王永铭, 杨藻宸. 大鼠动脉钙负荷模型的建立及验证. *中华医学杂志*, 1999, **79** (10): 769-772
- [8] 郭延松, 杨军珂. 大鼠动脉粥样硬化模型的建立. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 84-85
- [9] Midy N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. Vascular calcification and its relation to bone calcification, possible underlying mechanisms. *J Nucl Cardiol*, 2003, **10** (2): 177-183
- [10] Bostrom K. Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol*, 2001, **88** (2A): 20E-22E
- [11] Amley WW. Modification of experimental AS by calcium-channel blockers. *Am J Cardiol*, 1985, **55**: 164B-170

(此文编辑 朱雯霞)